

**Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet**

Igazgató: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár

1094 Budapest, IX. Tűzoltó u. 37-47.

Levélcím: 1444 Budapest, Pf. 263.

Tel.: 267-6261, Fax: 266-6656

E-mail: kellermayer.miklos@med.semmelweis-univ.hu

Dr. Makai Mihály, az MTA doktora

Titkár

Magyar Tudományos Akadémia

Doktori Tanácsa

1051 Budapest V.

Nádor u. 7.

Tel: 1/411-6286

Fax: 1/411-6233

**Bírálat****Nagy Péter:*****Az ErbB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége***  
**című MTA doktori értekezésére**

Nagy öröm és megtiszteltetés, hogy Nagy Péter *"Az ErbB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége"* című MTA értekezését bírálhattam. A bírálónak könnyű dolga van a kiváló disszertáció értékelésekor, mert az egy koncepciózusan felépített, kurrens tematikát felvonultató és rendkívül igényesen összeállított mű, amelynek háttérében komoly hazai és nemzetközi tudományos aktivitás és iskolateremtő teljesítmény húzódik.

Nagy Péter disszertációjában az epiteliális növekedési faktor (EGF) receptorainak (ErbB1-4 fehérjék) tulajdonságait és működési mechanizmusait vizsgálja, fókuszálva a receptormolekulák klaszterképzésre illetve azok bizonyos citosztatikumokkal szembeni érzékenység és rezisztencia kialakításában betöltött szerepére. Az ErbB fehérjék komplex, multidomén szerkezetű transzmembrán fehérjék, amelyek ligandumkötés hatására bonyolult, elsősorban az extracelluláris molekularészt érintő szerkezeti átrendeződésen mennek át, dimerizálódnak és komplex asszociátumokat képeznek, végül aktiválódik az intracelluláris kináz doménjük amely szerteágazó jelátviteli folyamatokat indít el. Az ErbB fehérje biológiai és orvosi jelentősége abban van, hogy jelátviteli utak központi eleme, a sejtnövekedés és proliferáció szabályozásában - és így tumoros állapotok kialakításában - igen fontos szerepet játszik, és ezért a tumorterápia egyik célpontjává vált. A jelölt témaválasztása ezért nemcsak időszerű, hanem közvetlen orvosi jelentősége is van. Az értekezésen két, egymással szoros kapcsolatban álló logikai ív vonul végig: az első azon módszerek fejlesztésével, standardizálásával és tesztelésével foglalkozik, amely az ErbB fehérjék asszociációinak egzakt mérését teszi lehetővé, megalapozva ezzel bonyolult sejtbiológiai kísérletek elvégzését; a második az ErbB fehérjék antitumor terápia hatására fellépő változásait vizsgálja. Kutatása részeiben és egészében is alaposan átgondolt és kidolgozott elméleti alapokon nyugszik. A felhasznált módszerek a kurrens biokémiai-

biofizikai és sejtbiológiai tudományok élvonalába tartoznak, sőt, a jelölt fejlesztőmunkája nagyban hozzájárult új, modern metodikák kidolgozásához.

A **jelölt téziseit elfogadom**, új és jelentős tudományos eredményeit a következőkben tudom összefoglalni:

1. Kifejlesztett két áramlási citometriás módszert, melyek a fluoreszcens fehérjékkel végzett kvantitatív FRET méréseket, illetve a fluoreszcens antitesttel jelölt fehérjék homoklaszterizációjának ugyancsak kvantitatív jellemzését teszik lehetővé.
2. Leírta a receptor asszociáció dimernél magasabb hierarchikus szintjeit. Bizonyította a háromszintű receptor klaszterizáció modell létjogosultságát. Kimutatta, hogy az ErbB1 és ErbB2 fehérjék jelentősen különböznek klaszterizációs tulajdonságaik szempontjából.
3. Bebizonyította, hogy az ErbB2 a lipid tutajokban helyezkedik el, és a tutajok lipid környezete gátolja az ErbB2 homoasszociációját. Rámutatott, hogy az ErbB3 magas lokális expressziós szintje szintén csökkenti az ErbB2 homoasszociáció mértékét.
4. Kimutatta, hogy az ErbB1 ligand-indukált internalizációját az ErbB2 gátolja, míg az ErbB3-nak erre nincs jelentős hatása.
5. Leírta, hogy a MUC4 transzmembrán mucin fokozott expressziója gátolja a trastuzumab citosztatikum kötődését az ErbB2-t fokozottan kifejező emlőtumor sejtekhez, és ennek hátterében az antitestkötő epitóp maszkírozása áll. Ugyancsak kimutatta, hogy a pericellulárisan elhelyezkedő hialuronsav szintén maszkírozza az ErbB2 fehérjét. A molekuláris maszkírozás tehát a trastuzumab rezisztencia kialakulásának egy új mechanizmusa.
6. Kimutatta, hogy a CD44 funkcionális molekuláris komplexet képez az ErbB receptorokkal, és mind ligandumjaik, mint a hozzájuk kötődő antitestek az egész komplex működését befolyásolják. Ezért az ErbB ellenes antitestek közvetetten befolyásolják a celluláris motilitási folyamatokat.
7. Megállapította, hogy az ErbB1 expresszió RNS interferenciával történő gátlása apoptózishoz vezet a receptort fokozottan kifejező sejtekben.
8. Bebizonyította, hogy az elisidepsin hatását a sejtek ErbB expressziója nem befolyásolja, és hogy a gyógyszer a lipid tutajokon keresztül fejt ki citotoxikus hatását.
9. A tudományos eredmények mellett feltétlenül fontosnak tartom megemlíteni a jelölt fejlesztő munkáját, amellyel megalapozta számos modern módszer kidolgozását. Ez a fejlesztőmunka nem csupán elméleti alapok kidolgozására és metodikák tesztelésére szorítkozik, hanem számítógépes programok megírását is jelenti (pl. Matlab és LabView programmodulok).

Az értekezés alapjául 12, nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemény szolgál, melyből a jelölt 11-ben terminális szerző. A cikkek mindegyike rangos nemzetközi folyóiratban jelent meg. A cikkek rangját jelzi, hogy a folyóiratok között található a *Nature Biotechnology*, a *Journal of Cell Science*, a *PNAS* és a *Cancer Research* is. Az utóbbi néhány év közleményeiben kiérződik, hogy azokban a meghatározó kísérletezési szerep már a tanítványoknak jut, amely aláhúzza a jelölt iskolateremtő törekvését és teljesítményét.

A disszertáció rendkívül gondosan szerkesztett, összeállított és kivitelezett mű. Az egész értekezésen az az igényesség, alaposság, körültekintés és kiegyensúlyozottság vonul át, amely Nagy Péter tudományos hozzáállását összességében jellemzi. Dicséretes és élvezetes a racionális, de nem excesszív magyarságra törekvés. A rendkívül lelkiismeretes és szabatos anyagban csupán elvétve fordul elő elírás, szakmai nomenklaturális hiba pedig szinte egyáltalán nem.

A disszertáció Bevezetés fejezetében lényegretörő összefoglalást olvashatunk az ErbB fehérjéről, azok szerkezetéről és ligandum-indukált konformációs változásairól. A jelölt a Bevezetésben ugyancsak átfogó képet ad arról, hogy milyen kísérleti kihívásokat és problémákat jelent a sejtfelszíni molekulák közötti asszociációk vizsgálata, és hogy a mérésekre milyen módszerek állnak rendelkezésre. A Célkitűzések összhangban áll az alaptermatikával és a logikai ívvel. Az Anyagok és módszerek fejezet részletes, de nem elaprózott módon tárgyalja az alkalmazott metodikákat. Ebben a fejezetben egy igen képzett, körültekintő és alapos kutató képe bontakozik ki. Az Eredmények és megbeszélés fejezet ugyancsak a logikai ív mentén, és a saját közlemények egymásra épülő rendszerében diszkutálja a felfedezéseket. Az egyes alfejezetek végén feltüntetett összefoglaló bekezdések dicséretesen állítják perspektívába az elért részeredményeket és könnyedén, logikusan vezetnek át a következő alfejezetbe.

**Megjegyzéseim és kérdéseim** kizárólag az értekezés nagyszerűségéből és gondolatébresztő jellegéből táplálkoznak:

***Általános megjegyzések:***

1. A jelölt jelentős mértékben járult hozzá az ErbB fehérjék működésének megértéséhez vagy a róluk alkotott korábbi modellek módosításához. Ezért hasznos lett volna látni egy olyan modell ábrát, amelyen összefoglalja az ErbB fehérjék működését, a sejtfelszíni molekuláris interakciós rendszerekbe való bekapcsolódását, és terápiás ligandumokkal való kölcsönhatását. Szívesen láttam volna egy ilyen összefoglaló ábrát és rövid fejezetet az Eredmények és megbeszélés fejezet végén.
2. A dolgozatban számos kiváló minőségű konfokális mikroszkópos felvétel szerepel különböző módszerrel fluoreszcensen megjelölt sejtekről. Ugyanakkor skálabeosztást csak a képek töredékén lehetett látni. Ez azért különösen zavaró, mert a mikroszkópos nagyítás meglehetősen széles skáláját alkalmazta a jelölt, és bizonyos felvételeken sok sejtet átfogó, nagy területek látszanak, másokon pedig csupán a sejtfelület részletei. Különösen az utóbbi esetekben lett volna hasznos, ha tájékozódni lehet a megjelenített mérettartományon.

***Részletes megjegyzések és kérdések:***

1. Az ErbB fehérje inaktív formája zárt állapotban van, melyet a II-es és IV-es domének közötti intramolekuláris híd stabilizál (7. oldal). Milyen kölcsönhatás ez az intramolekuláris híd? A zárt-nyitott átmenet (fluktuáció) hasonlít-e egyéb fehérjék, pl. motorfehérjék, G-fehérjék vagy bizonyos enzimek hasonló jellegű "hinge-bending" mozgásához? Mit lehet tudni az aktív (nyitott) állapot élettartamáról, azaz egy aktív ErbB fehérjemolekula átlagosan hány foszforilációs lépést tud katalizálni?
2. Az ErbB3-4 fehérjék a sejtmagban is előfordulnak (p. 11). Mit lehet tudni a nukleáris ErbB fehérjék szerepéről?

3. Az ErbB fehérjék sejtmotilitást befolyásoló hatásáról mind a Bevezetésben (p. 13), mind az Eredmények és megbeszélés fejezetben (p. 105-106) olvashatunk. Hogyan kapcsolódik be az ErbB fehérjerendszer a celluláris motilitásba? Elsősorban mely citoszkelétális rendszereket érintő motilitás játszik itt szerepet? Azért is különösen érdekes ez az aspektus, mert bizonyos mérések előtt igen eltérő hőmérsékleten történt a sejtek kezelése, és az alacsony hőmérséklet hatására (pl. jégen kezelés, p. 102) a mikrotubuláris rendszer depolimerizálódik.
4. Az ErbB fehérjék és bizonyos ligandumaik polarizált eloszlást mutatnak a sejt felületén (apikális vs. basális domének, p. 13). Mire vezethető vissza ez a polarizált eloszlás és mi tartja fenn? A jelölt által alkalmazott monolayer sejt kultúrákban megfigyelhető-e hasonló polarizált lokalizáció? Ha igen, az módosíthatja-e az ezen rendszereken mért eredmények értékelését?
5. A jelölt Singer-Nicholson membránmodellről megfogalmazott állításai (p. 16) tudományfilozófiai kérdéseket is felvetnek. Ha a modell alaptételei (lásd tengersizű lipidek és benne szabadon diffundáló fehérjemolekulák) nem tarthatóak, akkor a modellt el kellene vetni és nem azt revideálni, nemde?
6. A FRET eredetileg a Förster Rezonancia Energia Transzfer rövidítése - ellentétben a 22. oldalon olvashatókkal -, és csak abban az esetben jelenti a fluoreszcencia rezonancia energia transzfert, ha a résztvevő molekulapartnerek mindegyike fluorofór.
7. A "pixelben levő molekulák" kifejezés a dolgozatban többször előforduló (pl. pp. 27, 29, 72) érdekes és talán szerencsétlen megfogalmazás, hiszen a pixel síkban értendő, a molekulásoknak pedig térbeli kiterjedése van. Nem volna szerencsésebb a voxel kifejezést alkalmazni? Továbbmenve, az egy voxelbe eső fluoreszkáló molekulák számát befolyásolja a diffrakciólimitált optikai leképezés, vagyis a point spread function (PSD) térbeli mérete és alakja. Ezt az alkalmazott hullámhossz és a numerikus apertura határozza meg. Más szóval, az egy pixel mögött felsorakozott fluoreszkáló molekulák száma a PSD z-irányú kiterjedésétől is függ. Történt-e erre korrekció az egyébként rendkívül körültekintő mérések során?
8. A 7.B ábrán feltüntetett, 100%-os akceptor jelölésnél fellépő ~0.3 FRET hatásfok mire enged következtetni az ErbB2 szerkezetével kapcsolatban? Mi az oka a 7.B ábrán feltüntetett 0.3, illetve a 6.B ábrán látható 0.5 intramolekuláris FRET hatásfokok közötti különbségnek?
9. A homo-FRET mérések során fellép-e sötét komplex képződés (self-quenching)? Történt-e mérés ennek tesztelésére?
10. A FRET és egyéb fluoreszcenciás mérések során a leggyakrabban alkalmazott jelölés a fluoreszcens festékekkel előre megjelölt monoklonális antitestek használata. A jelölt meglehetősen szűkszavú az antitest-molekulák fluoreszcens jelölésével kapcsolatban, és gyári protokollok alkalmazására hivatkozik (p. 34). Lehet-e tudni, hogy egy-egy antitest-molekula hány fluorofórt hordoz, azaz, mekkora a jelölési hatásfok? Ha a jelölési hatásfok nagyobb mint 1 fluorofór/antitest (feltehetően igen), akkor ezt figyelembe kell-e venni a számításoknál?
11. A tumor téfogatot a jelölt tolómérővel mérte (p. 34). Mennyire pontos ez az eljárás? Hogyan tud korrigálni a tumor alakjára?

12. A FRET hatásfok alapján számított 6.29 nm R távolság (p. 59) összevethető-e az ErbB molekuláról alkotott szerkezeti modellekkel?
13. A 12. ábra diszkussziója elmaradt. Mi tehát a szérum éheztetés jelentősége a klaszterképződésben? A szérum éheztetést a jelölt általánosan alkalmazza kísérletei során. Mit lehet tudni arról, hogy ez az empirikus hatás mire vezethető vissza és milyen folyamatokat indít el egy sejtkulturában?
14. Mi az oka annak, hogy a BCF (bleaching correction factor) értéke antitestenként változott? Lehetséges, hogy ennek hátterében a fentebb is említett változó jelölési hatásfok áll?
15. A fluorofór pislogás (blinking) hogyan szól bele a mérési eredményekbe, különösen alacsony klaszterméret esetén?
16. A formalin fixálás jelentős mértékben (55%-ról mintegy 93%-ra) növelte az ErbB1-eGFP immobilis hányadát (p. 65), azaz jelentős mértékben limitálta a laterális diffúziót és mintegy befagyasztotta a molekuláris rendszert. Ilyen körülmények között az orientációs faktor ( $\kappa^2$ ) értékére továbbra is helyes a 2/3?
17. Az ErbB fehérjék sejtfelületi számával kapcsolatban több helyen is hasznos adatokat olvashatunk (4.7 fejezet). Az egyetlen sejtre eső receptorszám nagyjából a több százazertől a néhány millióig terjed. Honnan származnak és mennyire megbízhatóak ezek a számadatok? Ismerte az ErbB fehérje méretét és így az általa a membránban lefedett területet, továbbá a sejtfelület nagyságát, a receptorfehérjék egy-egy sejt felületének hányad részét borítják? Figyelembe véve, hogy egyéb transzmembrán fehérjék is benépesítik a sejtmembránt, valójában a membránfelület mekkora hányada lehet fehérjével fedett? Az így kialakuló sejtfelületi bezártság (confinement) vagy tömörülés (crowding) mennyiben járulhat hozzá egy fenomenológiai klaszterképződéshez? Más szóval, lehetséges, hogy az ErbB fehérjék részben csak azért állnak együtt mert a rendelkezésre álló tér limitált, de egyébként nem kapcsolódnak egymáshoz, és így a klaszterképződés sem valódi? Ugyancsak elgondolkodtató, hogy milyen a klaszterképződés dinamikája, tehát időbeli viselkedése. Mekkora az élettartama egy-egy klaszternek? Nem lehetne az élettartam alapján azonosítani a klasztereket, és ezáltal kizárni azokat a molekulakomplexeket, amelyek csak egy-egy véletlenszerű ütközés idejére tartózkodnak együtt?
18. Miért van az, hogy az ErbB2 heteroasszociáció mérésében (18. ábra) csak a sejtek szélei, azaz az a sejtfelületek (alsó és felső) áthajló élei vesznek részt? Mi a pontos magyarázata annak, hogy a sejtek élein nagyobb a fluoreszcencia (és FRET) intenzitás? A sejt egyéb felületén elhelyezkedő, de az analízisből kizárt molekulák mekkora hibát okozhatnak a mérésben?
19. A 21. ábrán hogyan kell értelmezni a klasztereket? Mi számít egy klaszternek?
20. A 22. ábrán igen nagy számú szabad ErbB1-eGFP (zöld folt) található, és megkockáztatom, hogy ezen tisztán zöld képfoltok száma meghaladja a sárga képfoltok, tehát klatrinnal asszociált molekulák számát. Mi ennek a magyarázata? A 22.B ábrán a fehérjék mely paraméterei kerültek ábrázolásra és mi a magyarázata az igen eltérő skálabeosztásnak? A klattrin paraméter eloszlására még inkább jellemző az aszimmetriás hisztogram mint az ErbB1-eGFP-ére. Erre is illeszthető több Gauss görbe?

21. A jelölt az ErbB fehérjék klaszterizációs modelljének tárgyalása során megemlíti a nagyméretű, többszáz fehérjét tartalmazó asszociátumokat (p. 77), amelyek már "fénymikroszkóppal is látható objektumok". Nincs itt valami ellentmondás? Nemde maga a jelölt végzett fluoreszcencia mikroszkópos méréseket ennél jóval kisebb méretű asszociátumokon?
22. A Laurdan generalizált polarizációja (p. 88) a jelölt bemutatása szerint többek között a membrán hidratáltságáról ad információt. Mit jelent a membrán hidratáltság?
23. A 35. ábrán bemutatott, térben differenciált szegmentációs eljárás valóban elegáns módszer arra, hogy a membránban illetve a membrán környezetében (pl. belfelületén) játszódó folyamatokat elkülönítsük. Az könnyen belátható, hogy a módszer remekül alkalmazható olyan sejtek esetében, amelyek gömb alakúak, és az analízis a gömb középpontját metsző síkra vonatkozik. Meglátásom szerint azonban ez az analízis csak fenntartásokkal alkalmazható olyan esetekben, amikor a sejt alakja jelentősen eltér a gömbtől, így például monolayer sejt kultúrában, ugyanis ilyenkor a membrán alatti pixelsorokba beleeshetnek jelentős méretű membránfelületek is. Milyen és mekkora mérési hibák jelentkezhetnek az utóbbi esetben?
24. A 37. ábra szerint jelentős mennyiségű MUC4 halmozódott fel egyes sejtek citoplazmájában. Mi lehet ennek a magyarázata?
25. A jelölt remek kísérletekben mutatta be, hogy a hialuronsav szintézis gátlása jelentősen hozzájárult a JIMT-1 xenograftokkal oltott egerekben kialakult tumor méretének csökkenéséhez, és felvetette a módszer klinikai alkalmazhatóságát. Figyelembe véve a hialuronsav rendkívül fontos szerepét elsősorban a kötőszövetekben, nem volna túl nagy a módszer alkalmazási kockázata?
26. A "scratch assay" módszere csak az Eredmények és megbeszélés fejezet legvégén kerül megemlítésre, és az Anyagok és módszerek fejezetben erről nem olvashatunk. Mi a módszer lényege, és hogyan származtatható ebből a mérésből következtetés a sejtmotilitásra?

A fenti kérdések és megjegyzések természetesen mit sem vonnak le azon meggyőződésből, hogy Nagy Péter elsőrangú, nemzetközi vonatkozásban is meghatározó jelentőségű és fontosságú tudományos teljesítményt foglalt össze disszertációjában. Részére a nyilvános vita kitűzését feltétlenül javaslom és támogatom, továbbá a mű elfogadására teszek javaslatot.

Budapest, 2013. május 26.

Dr. Kellermayer Miklós  
Egyetemi tanár, az MTA doktora